

文章编号: 1003-8701(1999)06-0024-05

# 分子标记在大豆遗传育种中的应用

李启云, 赵洪锬, 庄炳昌, 王玉民

(吉林省农业科学院生物技术重点开放实验室, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:** 从大豆种质的遗传多样性研究、大豆遗传图谱的构建及农艺性状定位等 3 个方面综述了分子标记在大豆遗传育种中的研究进展, 并指出其存在的问题及发展趋势。

**关键词:** 大豆; 分子标记; 遗传育种

**中图分类号:** S 565.103.53

**文献标识码:** A

生物技术的发展给作物遗传育种研究带来了巨大的变化, DNA 分子标记技术的应用是其中最显著的变化之一。由于分子标记相对于经典遗传育种研究中的形态性状具有无可比拟的优越性, 它的使用也越来越广泛。许多以前无法进行的研究, 比如环境因素的影响和数量性状的多重效应等, 在分子标记的帮助下已经开展。同时分子标记直接应用于辅助选择育种的研究, 在育种过程中利用分子标记技术进行鉴定、检测, 帮助亲本选择和品种的选育, 成为分子育种这门新兴学科中的重要组成部分。要使分子标记成为育种家的一种常规手段尚需一段时间, 但是分子标记在植物遗传育种中的应用研究方兴未艾, 我们可以从它的发展趋势看到其中所蕴含的巨大潜力与应用价值。

大豆起源于我国, 是世界上食用油和种子蛋白的主要来源之一, 占全世界食用植物油 30%~35%。大豆具有很高的营养价值, 大豆含有人体和动物不能合成的 8 种必需氨基酸, 还含有丰富的矿物质和维生素。大豆油的食用, 可防止因经常食用动物油而易产生的高血压、动脉硬化等心血管疾病。此外, 种植大豆还可培肥地力, 从而起到用地养地的作用。因此, 大豆的遗传研究一直受到广泛的重视。但是, 尽管人们从形态、生理生化、细胞遗传等方面进行了大量研究, 但与其它作物如玉米、水稻等相比, 其遗传研究进展十分缓慢。近 30 年来兴起的分子生物学技术, 尤其是 RFLP、PAPD、SSR、AFLP 等分子标记技术给各种生物, 特别象大豆这样难以用传统方法深入进行遗传研究的作物带来了极大的方便。本文以大豆为例介绍分子标记在植物育种中的研究进展。

## 1 大豆种质的遗传多样性研究

DNA 分子标记所检测的是植物基因组 DNA 水平的差异, 因而它非常稳定、客观。在分子图谱的帮助下对品种之间的比较可覆盖整个基因组, 大大提高了结果的可靠性。这种研究可用于品种资源的鉴定与保存、探讨作物的起源与进化和杂交亲本的选择等。

**收稿日期:** 1999-04-01

**基金项目:** 国家自然科学基金(39730330)

**作者简介:** 李启云(1974-), 男, 重庆市万县市人, 主要从事分子生物学研究。

大豆种质资源是大豆遗传改良的基础,正确评定种质资源的变异特点,确定其间的遗传关系,有利于正确制定大豆育种策略,加速大豆改良的进程。Apuya 等(1988)首先报道了大豆的 RFLPs, Keim 等(1989)对 *Soja* 亚属的 58 个材料的 RFLPs 进行了研究,得出了大豆变异性较低的结论,但是栽培大豆与野生大豆相比,野生大豆变异性比栽培大豆要高。Keim 等(1992)对 38 个在北美大豆育种中使用过或正在使用的栽培大豆种质材料的遗传距离和遗传关系进行了 RFLPs 分析,揭示出这些材料间的变异性也相对较低。之后 Maughan 等(1996)对 23 份不同的野生大豆和栽培大豆品种进行了 AFLP 分析,通过 15 对引物组合,对获得的 759 条扩增谱带进行分析,也表明野生大豆种间变异性较高。邱丽娟等(1997)运用 RAPD 标记对大豆种质研究表明,基于大豆种质差异明显的地域区划,可以从国内外选择不同地区种质资源以拓宽中国栽培大豆的遗传基础。

Shoemaker 等(1992)首先讨论了利用分子连锁图对大豆种质的基因组作追溯分析,以鉴定育种工作者所经常选择的特定基因组区段。之后 Lorenzen 等(1995)对美国在 1939~1990 年间的 64 个大豆品种进行了详尽的基因型分析,清楚地揭示了这些大豆品种的育种演变过程。该类分析还能揭示大豆代代传递的连锁区段,评价大豆品种间的遗传关系,估计育种过程中所发生的遗传重组的频度,以及能够进行系谱的作图分析等。

惠东威等(1997)运用 DNA 标记和 ITS-I 序列分析对大豆的分类系统进行了研究,从重建的谱系树中可以看出一些原先划分的种中存在不同的基因组分化类型,如 *G. tomentella*、*G. canesens* 和 *G. tabacina*,它们可能是被形态划分所遮蔽的种,表明形态分析在一定程度上不能区分一些种基因组的分化类型。

所有这些在 DNA 分子水平上对大豆种质进行的分析,都更准确地评定了各种质的遗传特征和相互的关系,为进一步加速大豆遗传改良乃至大豆基因组研究奠定了基础。

## 2 大豆遗传图谱的构建

从基因组的特征来看,大豆基因组在被子植物中是较大且较为复杂的。大豆基因组的大小约在  $1.29 \times 10^9 \sim 1.81 \times 10^9$  bp 之间,其中 40%~60%的是重复序列(Gurley 等, 1979; Arumanagathan 等, 1991)。相对于其它作物而言,大豆的经典遗传图谱发展十分缓慢。例如,迄今大豆上已鉴定的包括形态、色素和同工酶在内的常规标记约 250 个,但能分配到连锁图上的只有 63 个(Palmer 等, 1987, 1993)。造成这种状况的主要原因包括:①缺乏合适的遗传材料;②形态标记及细胞遗传标记数少;③大豆的有性杂交比较困难,所以经典遗传学方法难以建立饱和的大豆遗传图。

可喜的是,随着分子生物学技术的发展,各种分子标记手段不断涌现,利用种间杂交群体、种内杂交群体、等位基因系、近等基因系和重组自交系,已获得了数以百计的 RFLP 和 RAPD 标记(Lark et al. 1993; Rafalski and Tingey, 1993; Shoemaker, 1994; 张德水等, 1997),而且 Keim 等(1997)获得了 650 个 AFLP 标记, Cregan 等(1998)获得了近 540 个 SSR 标记,其中, Keim 等(1997)利用两个栽培大豆(BSR101×P1437.654)杂交构建的 RIL 群体,在 RFLP、RAPD 标记的基础上,进一步通过 AFLP 标记,构建了一个高密度的连锁图谱,包括由 165 个 RFLP 标记、25 个 RAPD 标记和 650 个 AFLP 标记,28 个连锁群,覆盖基因组达 3441 cM 的分子连锁图。这些为建立高密度饱和遗传图谱奠定了基础。

如果将由不同群体所建图谱的信息融合,无疑将加速提高大豆遗传图谱的饱和度。Stam(1993)发展的 JoinMap 软件,可以不同群体间共同的标记为基础,将属于各自群体的新

标记整合在一起。尽管由此获取的图谱信息不如所有标记源自单一群体时准确,但它提供给研究者的参考价值仍是很大的。

虽然分子连锁图谱的标记密度增加很快,但如果它不整合尽可能多的常规标记,将限制其在育种和遗传研究中的可用性(Hauge 等,1993;Palmer 等,1993)。为了研究重要农艺性状,Lark 等(1993)用两个栽培大豆杂交的  $F_2$  群体,构建了一个由 132 个 RFLPs、同工酶、形态及生化标记组成的连锁图,该图包含 31 个连锁群,覆盖基因组长度为 1 550 cM。大豆分子连锁图已包括了几个常规标记,这是因为这些在用于作图的群体中表现了分离,致使其与分子标记同时被作图定位(Keim 等,1990;Dier 等,1992;Lark 等,1993;Shoemaker 等,1993)。此外,一些研究者还针对某些常规标记构建了  $F_2$  分离群体,检测它们与已定位的分子标记间的连锁(Landan-Ellis 等,1991;Diers 等,1992;Weiseman 等,1992),并由此推断这些常规标记所属分子连锁群。但是,在这些  $F_2$  群体中表现分离的分子标记是有限的,往往不足以进一步确定标记在某分子连锁群上的特定位置。为了实现将较多的常规标记整合到分子连锁图上,研究者们又构建了几个不同的特定群体(Nickell 等,1994;Polzin 等,1994;Shoemaker 等,1995),其中最有代表性的是 Shoemaker 等(1995)用两个近等基因系 Clark 和 Harosey 构建成的群体。在该群体中共计 20 个形态和同工酶标记表现分离。据此,他们通过 JoinMap 作图软件将这些与已定位 RFLP 座位连锁的常规标记整合到了先前的图谱上,Chen 等(1997)又将 Cgy1 和 Shr 两个基因整合上去,从而极大地提高了图谱的可用性。Cregan 等(1998)利用 540 个 SSR 标记和一系列同工酶及常规标记,构建了一个“公共图谱”,包含 20 个连锁群,覆盖基因组达 2 750 cM,这是大豆遗传学研究的一个重要里程碑。

### 3 大豆基因定位研究

饱和分子图谱的构建使基因定位的工作变得相对容易。基因定位可以在不同的分离群体中进行,如  $F_2$  群体、回交群体、加倍单倍体群(DH 群体)和重组自交系群体(RI 群体)等,不同的群体各有自己的特点(表 1)。

表 1 大豆基因定位研究

性 状	文 献	性 状	文 献
Phytophthora 根腐病抗性(Rps)	Diers 等,1992c; Polzin 等,1994;Hegstad 等,1997	种子油脂(%)	Diers 等,1992
高棕榈酸含量(Fap2)	Nickell 等,1994	脂肪酸(%)	Mansur 等,1993;1996; Qiu 等,1997
亚低油酸含量(Fan)	Brummer 等,1994b	产量	Diers 等,1992
大豆花叶病毒抗性(iRSV <sub>2</sub> )	YU YG 等,1994	子粒重量	Mansur 等,1996
(Rsa)	张志永等,1998	生殖性状	Mansur 等,1993 Keim 等,1990
大豆灰斑病菌抗性	邹继军等,1998	形态性状	Mansur 等,1993 Keim 等,1990
开花期	Mansur 等,1996 Li-Jie Ran 等,1996	营养效率(Fe)	Mansur 等,1993
成熟期	Lee 等,1996	孢囊线虫抗性	Diers 等,1992;lin 等,1997 Concilio 等,1994,1997
株高	Mansur 等,1996	叶长	Vierling 等,1996; Diers 等,1997
抗倒性	Mansur 等,1996	叶宽	Mansur 等,1996
子粒大小	Mansur 等,1996		
子粒硬度	Keim 等,1990		
种子蛋白(%)	Diers 等,1992 Mansur 等,1993;1996		

在大豆中,已定位了多种重要农艺性状,包括生殖性状、子粒性状、种子组成、营养特征、

形态特征、抗病特性及营养效率等。

质量性状的基因定位相对简单,但数量性状座位(QTLs)的鉴定工作却异常艰巨。首先,要确保所鉴定的 QTLs 的真实性,必须严格控制环境变异的影响。另外,在某一群体中出现并分离的 QTLs 可能不同于出现于另一群体中的 QTLs(Tanksley 等,1988)。所以为了获得对基因组中 QTLs 的综合阐释,需要在一系列地点和年份对多个群体进行研究。虽然已有许多 QTLs 被研究定位(表 1),但迄今它们中的大多数的定位,仅是基于用作构建图谱的群体。因此,除了有关孢囊线虫抗性的定位研究结果外,表 1 所列的 QTLs 的定位仅为初步研究结果。通过使用多个基因型组合以及多种环境对 QTLs 进行详尽分析,可使得 QTLs 的定位更加准确,而且也有助于阐明迄今尚不了解的有关数量性状的变异由群体来维系的机制问题。影响 QTLs 定位准确性的另一困难是,要有足够大的定位群体。再者,我们对 QTLs 的生理效应和单个 QTL 对性状表达的真实影响知之甚少,也是 QTLs 定位所面临的一个难题。不过,这一难题的限制可通过构建成仅在单一 QTL 座位上有差异的近等基因系来克服,例如,通过比较近等基因系,可以清楚地揭示单个 QTL 对大豆蛋白或油质量表达的真实效应(Diers 等,1992)。

目前,Imssande 等(1998)利用大豆 QTLs 鉴定工作已有资料得出一些初步的结论表明, QTL 并非均匀分布在整个基因组,而更倾向于在特定染色体的特定区域分布。例如,L 连锁群包含 18 个 QTL,而其它连锁群没有。另外,相关子粒性状或抗病性等 QTLs 可能是紧密连锁的。

## 4 展 望

尽管大豆基因组研究存在一些固有的困难,目前其进展已趋近于其它的重要作物,而且随着一些具有更高信息量的分子标记技术的发展和运用,特别是 AFLP 和 SSR 标记的发展,大豆基因组内缺乏大量遗传多态性的限制也将被克服。大量基因及各种性状的 QTLs 的准确定位不仅将把分子标记辅助育种(MAS, marker-assisted selection)推向实用化,也将基于图谱的基因或 QTLs 的克隆工作开始付诸实施。

但是,这不仅需要精细的具有紧密连锁标记的遗传图谱,同时还需要特定的基因文库的构建,才能将不同遗传标记之间与物理图谱联系起来。迄今为止,BAC 文库的构建已覆盖了大豆基因组的许多倍,Marek and Shoemaker(1997)利用这些通过不同酶切和不同基因型构建的文库,发展了精细的物理重叠克隆群。

当然,细胞遗传学的发展也有助于经典遗传学和分子遗传学的发展,Singh and Hymowitz(1988)基于减数分裂粗线期染色体分析,构建了一个完整的细胞遗传学图谱。三体( $2n=41$ )对于在特定染色体上基因的快速定位和连锁群的分配提供了极大的方便,Xu 等(1998)利用非整倍体品系,已构建了一整套(20)三体材料,象细胞遗传学为其它作物提供的方便一样,这也将最终有助于大豆经典遗传学和分子遗传学的结合。

## 参 考 文 献

- [1] 张志永,盖钧镒. RFLP 在大豆种质资源及遗传连锁研究中的应用[J]. 大豆科学,1995,14(4):341-348.
- [2] 陈绍江. 大豆分子标记研究进展[J]. 大豆科学,1995,14(4):334-340.
- [3] 张德水,董伟,惠东威,等. 用栽培大豆与半野生大豆间的杂种  $F_2$  群体构建基因组分子标记连锁框架图[J]. 科学通报,1997,42(12):1326-1330.
- [4] 惠东威,等. 利用 rRNA 基因 ITS-1 序列构建的大豆属(*Glycine*)12 个种的种系关系[J]. 中国科学(C),1997,27(4):327

—333.

- [5] 钱惠荣,等·DNA 标记和分子育种[J]. 生物工程进展,1998,18(3):12—18.
- [6] 张志永,等·大豆花叶病毒抗性基因 Rsa 的分子标记[J]. 科学通报,1998,43(20):2197—2202.
- [7] 邹继军,等·大豆对灰斑病菌 7 号小种抗性的遗传分析及抗病基因的 RAPD 标记[J]. 科学通报,1998,43(21):2302—2307.
- [8] Arumanagathan K. et al·Nuclear DNA content of some important plant species [J]·Plant Mol·Biol·Rep.,1991(9):229—241.
- [9] Diers B W, et al·RFLP analysis of soybean seed protein and oil content [J].Theoretical and Applied Genetics, 1992,83:608.
- [10]Diers B W, et al·Possible identification of quantitative trait loci affecting iron efficiency in soybean [J]. Journal of Plant Nutrition, 1992,15:2127—2136.
- [11] Diers B W, et al· Mapping of phytophthora resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers[J]. Crop Science, 1992,32:377—383.
- [12] Gurley W B, et al·Sequence organization of the soybean genome [J].Biochemica et Biophysica Acta, 1979(561):167—183.
- [13] Hauge B M, et al· An integrated genetic /RFLP map of the arabidopsis thaliana genome [J].Plant Journal, 1993(3):745.
- [14] Imsande M, et al· QTL in soybase; a new perspective[J].Soybean Genetics Newsletter, 1998, 25:146—148.
- [15] Keim P, et al· Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean [J].Theoretical and Applied Genetics, 1989,77:786—792.
- [16] Landau-Ellis D, et al·The genetic locus controlling supernodulation in soybean (*Glycine max* L.) co-segregates tightly with a cloned molecular marker [J]. Mol·Gen·Genet, 1991,228:221—226.
- [17] Lark K G, et al· A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars :Minsoy and Noir I [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993,86:901—906.
- [18] Mansur L M, et al· Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [J]. Crop Sciences, 1996,36(5):1327—1336.
- [19] Maughan P J, et al· AFLP in soybean; species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis [J].Theoretical and Applied Genetics, 1996,93(3):392—401.
- [20] Mickell A D, et al·The Fap<sup>2</sup> locus in soybean maps to linkage group [J]. Journal of Heridity, 1994,85:160—162.
- [21] Palmer R G, et al· Qualitative genetics and cytogenetics·Soil Science Society of America, 1987,135—209.
- [22] Palmer R G, et al· Linkage map of soybean (*Glycine max* L. merri). In: O'Brien, S. J. (ed) Genetic maps; locus maps of complex genomes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993,6139—6148.
- [23] Paul Keim, et al· A high-density soybean genetic map based on AFLP marker [J]. Crop Sciences, 1997(37):537—543.
- [24] Polzin K M, et al· 1994 Rps<sup>2</sup>, Rmd, and Rj<sup>2</sup> are integrated into linkage group J of the soybean molecular map [J]. Journal of Heridity, 1994,85:300—303.
- [25] Qiu Lijuan, et al· Evaluation of soybean germplasm with random amplification polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, (23)4:408—417.
- [26] Shoemaker R C, et al· Molecular genetic mapping of soybean; map utilization [J]. Crop Science, 1992(32):1091—1098.
- [27] Shoemaker R C, et al· Molecular linkage map of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.]. Cold Spring Harbor, 1993,6131—6138.
- [28] Shoemaker R C, et al· Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups [J]. Crop Science, 1995(75):436—446.
- [29] Stam P· Construction of interated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map [J]. Plant Journal, 1993(3):739—744.
- [30] Tanksley S D, et al· Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. Proc· Natl· Acad· Sci., 1988(85):6419—6223.
- [31] Weisemann J M, et al· Molecular markers located proximal to the soybean cyst nemtode resistance gene, Rhg<sup>4</sup> [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992(85):136—138.
- [32] Xu S, et al· Establishment of a cytogenetic map of soybean; current status [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1998,25:120—122.